

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO LEITE FERRAZ DE CAMPOS

ASSOCIAÇÃO ENTRE TABAGISMO, HAPLÓTIPOS HLA-A, -B, -DR E GENES DE  
RECEPTORES OLFATÓRIOS



CURITIBA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO LEITE FERRAZ DE CAMPOS

ASSOCIAÇÃO ENTRE TABAGISMO, HAPLÓTIPOS HLA-A,-B,-DR E GENES DE  
RECEPTORES OLFATÓRIOS

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Marques Magalhães

CURITIBA

2014

*"Os limites da ciência não são os limites da  
nossa inquietude, dos nossos ideais, das  
nossas mais profundas aspirações: essas são  
ilimitadas. Nossa sede de conhecimentos é  
uma sede de infinito"*

*Newton Freire - Maia*

À minha família e amigos. Em especial à  
Ana Júlia Cunha, pelo carinho,  
compreensão e estímulo. Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Várias foram as pessoas que contribuíram para a minha formação durante estes cinco anos de graduação. Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. João Carlos Marques Magalhães, que desde o princípio depositou total confiança em meu trabalho e sempre esteve presente nesse período. Obrigado pelos valiosos conselhos tanto biológicos quanto pessoais.

Um grande agradecimento ao M<sup>e</sup> Waldir Antônio da Silva, que sempre esteve disposto a ajudar com os bancos de dados e discussões ao longo de toda a construção do trabalho. Obrigado Waldir, sua ajuda foi essencial para a finalização dos estudos.

Ao Dr. Pablo Sandro Carvalho Santos pela orientação e apoio em grande parte do trabalho.

Ao M<sup>e</sup> José Samuel da Silva que cedeu gentilmente seus dados para auxiliar em uma parte da análise do trabalho.

Aos meus pais por sempre terem me apoiado e estarem comigo em todos os momentos, me dando força, confiança e carinho. Obrigado por terem aguçado o meu lado crítico e mostrado os verdadeiros valores da vida.

Um agradecimento especial à minha namorada Ana Júlia Cunha, que sempre me apoiou me dando força, incentivo e carinho. Obrigado pela paciência e por estar ao meu lado todo esse tempo. Te amo!

Aos meus irmãos de sangue e de coração Adriano e Felipe, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim.

Ao amigo de infância Adirson Maciel de Freitas Junior, pelas boas conversas e momentos que não se apagam com a distância. Obrigado por estar ao meu lado esse tempo, grande parte do que sou hoje se deve a você.

Aos meus padrinhos Mari e Roberto. Obrigado por apoiarem meus estudos desde sempre e pelo carinho e dedicação.

Aos amigos da república "Miro two" que me aguentaram ao longo de dois anos, e proporcionaram belos momentos de descontração e amizade.

Aos amigos de graduação. Em especial a Carolina Souza Nascimento (*in memoriam*), Carol, Felipe, Ricardo, Henrique, Leonardo de Paula pela amizade e pelos momentos de alegria que passamos juntos.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 11 |
| 2. OBJETIVOS GERAIS.....   | 13 |
| 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 13 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 14 |
| 3.1. CROMOSSOMO 6 E MHC.....   | 14 |
| 3.2. GENES HLA DA REGIÃO MHC DE CLASSE I, II e III.....  | 16 |
| 3.2.1. MHC de Classe I.....  | 16 |
| 3.2.2. MHC de Classe II.....   | 16 |
| 3.2.3. MHC de Classe III.....  | 18 |
| 3.3. MHC ESTENDIDO (xMHC).....   | 18 |
| 3.4. RECEPTORES OLFATÓRIOS .....   | 19 |
| 3.5. OLFATO E MHC .....  | 21 |
| 3.6. TABAGISMO, MHC, OLFATO E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO .....   | 22 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 24 |
| 4.1. AMOSTRA .....   | 24 |
| 4.2. CÁLCULO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS E ANÁLISE DOS DADOS<br>OBTIDOS.....                                | 24 |
| 4.3. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE tagSNPs<br>DE GENES OR E HAPLÓTIPOS HLA..... | 25 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....   | 26 |
| 6. CONCLUSÕES .....  | 30 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 31 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1- ORGANIZAÇÃO DO MHC EM HUMANOS .....   | 15 |
| FIGURA 2- ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E II .....  | 17 |
| FIGURA 3- MAPA DO MHC DE CLASSE III HUMANO .....  | 18 |
| FIGURA 5- CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES<br>ACOPLADOS À PROTEÍNA G.....   | 21 |
| FIGURA 7- MAPA GENÔMICO MOSTRANDO OS GENES MHC HUMANO E<br>GENES RECEPTORES OLFATÓRIOS (OR) INSERIDOS ENTRE AS REGIÕES<br>6p21.33 e 6p21.31 ..... | 23 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1- CLUSTERS E SUPERCLUSTERS DE GENES DENTRO DO MHC<br>EXTENDIDO .....  | 20 |
| TABELA 2- HAPLÓTIPOS COM ASSOCIAÇÃO CONSISTENTE EM TODOS OS<br>SUBGRUPOS .....  | 27 |
| TABELA 3 - NÚMERO ESTIMADO DE INDIVÍDUOS PORTADORES DOS<br>HAPLÓTIPOS HLA-A1-B8-DR3, HLA-A24-B7-DR1 E PARA O TOTAL DA<br>POPULAÇÃO..... | 28 |
| TABELA 4 - MAIORES FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS HLA DOS 61 TRIOS<br>FAMILIARES.....   | 29 |



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                      |  |
|----------------------|--|
| BTN-                 | Gene da proteína butirofilina                                      |
| GG-                  | Gânglio Grueneberg   |
| GPCR-                | Receptor acoplados à proteína G                                    |
| HFE-                 | Proteína de hemocromatose humana                                   |
| HLA-                 | Antígeno Leucocitário Humano                                       |
| IC-                  | Intervalo de confiança   |
| KIR-                 | <i>killer immunoglobulin-like receptors</i>                        |
| LD-                  | Desequilíbrio de Ligação   |
| LES-                 | Lúpus eritematoso sistêmico  |
| LIGH-                | Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade                |
| LTA-                 | Linfotoxina alfa   |
| Mb-                  | Megabases  |
| MHC-                 | Complexo Principal de Histocompatibilidade                         |
| MHCx-                | Complexo Principal de Histocompatibilidade Estendido               |
| OE-                  | Epitélio olfativo  |
| or-                  | <i>odds ratio</i>  |
| OR-                  | Receptor Olfatório   |
| SNP-                 | Polimorfismo de Nucleotídeo Único                                  |
| SO-                  | Órgão septal de Maserà   |
| SSO-                 | Sondas oligonucleotídicas específicas                              |
| T CD4 <sup>+</sup> - | Linfócito T que expressa a molécula de superfície CD4 <sup>+</sup> |
| T CD8 <sup>+</sup> - | Linfócito T que expressa a molécula de superfície CD8 <sup>+</sup> |
| TCR-                 | Receptores de células T  |
| TCR-                 | Receptores de células T  |
| TNF-                 | Fator de necrose tumoral   |
| VNO-                 | Órgão vomeronasal  |

## RESUMO

O hábito tabagista parece estar geneticamente associado a genes de receptores olfatórios. Um grupo destes genes encontra-se em forte desequilíbrio de ligação com a região HLA, no cromossomo 6. O presente trabalho teve por objetivo investigar a frequência de haplótipos HLA e sua relação com o tabagismo em uma amostra da população paranaense, através do estudo de associação. A amostra ( $n = 74144$ ; fumantes = 13019; não-fumantes = 61125) provém do banco de dados de doadores voluntários de células tronco hematopoiéticas do LIGH (Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da UFPR), previamente genotipado para os *loci* HLA-A, -B, -DR em baixa/média resolução pela técnica SSO (sondas oligonucleotídicas específicas). As frequências haplotípicas foram estimadas pelo método da maximização de expectativas. A análise de associação foi feita por *odds ratio* para cada haplótipo. A fim de evitar artefatos estatísticos, novas análises foram realizadas dividindo-se a população por etnia e sexo, buscando associações consistentes em todos os subgrupos. Dos 14540 haplótipos encontrados, 188 apresentaram *odds ratio* significativo nos dois sexos, sendo 18 associações positivas (mais frequentes em fumantes) e 170, associações negativas (mais frequentes em não fumantes). Além do haplótipo já conhecido, apenas o haplótipo HLA-A24-B7-DR1 apresentou associação consistente em todos os subgrupos. Os *odds ratios* (*or*) e intervalos de confiança (*IC*) para o total da amostra foram: homens, *or* = 1,618; *IC* = [1 – 2,59]; mulheres, *or* = 1,712; *IC* = [1,13 – 2,59]. Este é o segundo haplótipo HLA possivelmente associado ao tabagismo e também está em associação positiva, podendo ser um fator de risco na aquisição do hábito.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tabagismo; Receptor Olfatório; Haplótipo HLA;

## ABSTRACT

Tobacco smoking behavior seems to be genetically related to olfactory receptor genes, and part of them are known to be in strong linkage disequilibrium with HLA region on chromosome 6. In the present work we have investigated the relation between HLA haplotypes frequencies and tobacco smoking behavior in a sample of Paraná's population through a genetic association study. The sample (n= 74144; smokers; 13019; non-smokers = 61125) was available at the LIGHS's (Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade of UFPR) database for hematopoietic stem cell donors, which were genotyped for HLA A, B and DR loci at low/medium resolution using SSO technique. Haplotype frequencies were estimated by expectation-maximization method. The association analysis was performed by estimation of odds ratios for specific haplotypes. In order to avoid statistical artifacts , new analyzes were performed by dividing the population by ethnicity and gender categories, aiming to find consistent associations in every subpopulation. Of the 14540 haplotypes found, 188 had significant odds ratio in both genders (more frequent in smokers) and 170 had negative association (more frequent in non-smokers). Besides the already known association, HLA A24-B7-DR1 was the only haplotype that showed a consistent association in all subgroups. Odds ratio (or) and confidence interval values (CI) in the whole sample were: men, or = 1,618; CI = [1 - 2,59]; women, or = 1,712; CI = [1,13 - 2,59]. This is the second HLA haplotype that can possibly be associated with tobacco smoking habit, and it is also in positive association, indicating it to be a risk factor in smoking habit acquisition.

**KEYWORDS:** Smoking behavior; Olfactory receptor; HLA haplotype.

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema olfativo possibilita aos seres humanos a capacidade de perceber, discriminar e reagir diante de uma gama de compostos químicos disseminados no meio ambiente. Um estímulo químico presente no ambiente desencadeia um impulso elétrico na membrana do neurônio olfativo através do contato com os receptores olfatórios. Esses estímulos são então levados para o bulbo olfatório e posteriormente conduzidos para regiões cerebrais que identificam determinado odor (MALNIC *et al.*, 1999). Existe na natureza uma grande variação no número de genes que codificam receptores olfatórios para as diferentes espécies, podendo variar de 48 a 367 em insetos (MITCHELL *et al.*, 2012) 1500 em camundongos (GODFREY *et al.*, 2004).

A organização do sistema olfatório, em humanos, foi descrita nos estudos de Buck e Axel (1991), o que lhes rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2004. Este sistema abrange uma grande família gênica, aproximadamente 1000 genes, que codificam para proteínas que atuam como receptores olfatórios. Mcclintock (1971) observou que pode haver certa sincronização de ciclos menstruais de mulheres que convivem em um mesmo ambiente, sendo um forte indício de como o olfato influencia em características comportamentais humanas. Evidências crescentes sugerem que a escolha preferencial de parceiros, percepção do ambiente, reconhecimento da prole e de parentesco, seleção gamética e até mesmo o hábito tabagista e outras funções podem estar relacionados ao alto grau de polimorfismo existente na região MHC (complexo principal de histocompatibilidade), provavelmente devido ao forte desequilíbrio de ligação destes com genes de receptores olfatórios.

O hábito tabagista, grave ou moderado, parece sofrer influência de fatores genéticos (SULLIVAN; KENDLER, 1999), herdabilidade de aproximadamente 60% (KENDLER *et al.*, 2000), tendo sido encontradas evidências de genes associados em diversas regiões do genoma, incluindo os achados de Füst *et al.* (2004) que descrevem associação com haplótipos da região genômica do HLA (Antígenos Leucocitários Humanos), possivelmente devido ao forte desequilíbrio de ligação desta com um *cluster* de genes que codificam para receptores olfatórios (OR) da mesma região cromossômica. Santos *et al.* (2008), encontraram evidências de

associação com o haplótipo HLA-A1-B8-DR3 e um receptor OR (gene: OR12D3, SNP: rs3749971).

A determinação de alelos relacionados ao hábito tabagista, juntamente com aqueles já estudados nas pesquisas de Santos *et al.* (2008) e Füst *et al.* (2004) é importante para a compreensão da etiologia desta condição, e fornece dados para novas investigações científicas a respeito desse tema. Isso porque o tabagismo está relacionado com o desenvolvimento e avanço de várias doenças graves, tais como doença arterial coronária, câncer de vários órgãos e doenças autoimunes. O presente trabalho tem como objetivo levantar novos dados que contribuam na investigação dos mecanismos que predispõem ao hábito tabagista.

## 2. OBJETIVOS GERAIS

Investigar as frequências dos haplótipos HLA-A, -B, -DR e sua relação com o tabagismo por intermédio da razão de possibilidades (*odds ratio*) em grupos de mulheres e homens, fumantes e não fumantes, em uma amostra de diferentes origens étnicas da população paranaense.

### 2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calcular as frequências haplotípicas em amostras de fumantes e não fumantes da população paranaense;
- Investigar os *odds ratio* entre haplótipos de homens e mulheres fumantes e não-fumantes;
- Verificar se algum destes haplótipos está associado aos indivíduos fumantes, buscando associações consistentes em todas as amostras, conforme a origem étnica (amarelo, branco, negro e pardo);
- Determinar se estes haplótipos encontram-se em desequilíbrio de ligação com genes de receptores olfatórios, através da análise molecular *in silico* de uma amostra da população CEU (norte americanos com ascendência europeia) do banco de dados HapMap, a fim de compará-la com os resultados da população paranaense.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. CROMOSSOMO 6 E MHC

Constituído por cerca de 166.880.988 pares de base, 1557 genes e 633 pseudogenes, o cromossomo 6 representa cerca de 6% do genoma humano e é considerado um dos maiores cromossomos sequenciados até os dias de hoje (MUNGALL *et al.*, 2003)(FIGURA 1).

O cromossomo 6 é altamente rico em genes relacionados ao sistema imunológico, mas também apresenta genes que afetam características de comportamento e percepção sensorial (ZIEGLER, 1997).

O Complexo Principal de Histocompatibilidade ( MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) está situado no braço curto do cromossomo 6, na região 6p21.3. Contendo mais de 200 genes (CAMPBELL; TROWSDALE, 1993; COMPLETE sequence and gene map of a human major histocompatibility complex, 1999 ) os mais polimórficos do genoma humano, recebe a designação de HLA em humanos( *Human Leucocyte Antigens* ), por ter sido inicialmente detectado nos leucócitos. O MHC ocupa uma grande região cromossômica (aproximadamente 4Mb de DNA), abrangendo o sistema gênico *HLA* e outros genes não pertencentes a esse sistema (CARROSELLA *et al.*, 1999; O'CALLAGHAN; BELL, 1998) (FIGURA 1). Essa região contém um conjunto de genes que são expressos de forma codominante e está presente no genoma de todas as espécies de vertebrados. Foi descrito primeiramente em observações no ano de 1936 no fenômeno de aceitação e rejeição de transplantes de tecidos entre camundongos alogênicos ou singênicos (o complexo H-2 de camundongos) (GORER, 1936; KLEIN, 1986). Entretanto, a sua função primordial é a de apresentador de antígenos aos linfócitos T, constituindo a base molecular para que o sistema imunológico possa distinguir proteínas próprias do corpo das proteínas produzidas por invasores estranhos, tais como vírus e bactérias ( ABBAS; LICHTMAN, 2012). O MHC foi subdividido em três regiões, levando em conta a estrutura e função dos seus produtos moleculares: classe II (centromérico), classe III e classe I (telomérico) (LAMM *et al.*, 1985; BELL, 1989; CHRISTIANSEN *et al.*, 1994), como mostrado na figura 1.





### 3.2. GENES HLA DA REGIÃO MHC DE CLASSE I, II e III

#### 3.2.1. MHC de Classe I

A região HLA de classe I compreende mais de 122 locos. Os genes que codificam para a cadeia  $\alpha$  das moléculas HLA de classe I são conhecidos como clássicos ou de classe Ia ( genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* ) ( STRACHAN, 1987) e são altamente polimórficos (FIGUEROA *et al.*, 1988). Essas moléculas são expressas por todos os tipos celulares nucleados e plaquetas, e interagem com o receptores de células T (TCR), bem como receptores KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*) expressos em células "*natural killer*" e algumas células T (TROWSDALE, 2001). Além dos locos clássicos, o HLA de classe I compreende três locos não clássicos (*HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*), sendo pouco polimórficos. Há, ainda, nesta região os locos considerados pseudogenes (*HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L*)(CAMPEBELL; TROWSDALE, 1993)

As moléculas MHC clássicas de classe I (A, B e C) e classe II (DR, DQ e DP) apresentadoras de antígenos são formadas por duas cadeias glicoproteicas expressas na superfície celular. A molécula de classe I se completa com uma cadeia leve de  $\beta$ 2- microglobulina (GUSSOW *et al.*, 1987), a qual é codificada por um gene localizado no cromossomo 15 (FIGURA 2, ilustração da esquerda).

A sequência do gene HLA de classe I foi determinada por Malissen *et al.* (1982). Assim como no rato, a organização dos domínios das proteínas do HLA reflete precisamente as estruturas dos íntrons e éxons do gene: éxons separados codificam o peptídeo de sinal, cada um dos três domínios externos e a região transmembrana, enquanto três éxons codificam o pequeno domínio citoplasmático (HOOD *et al.*, 1982).

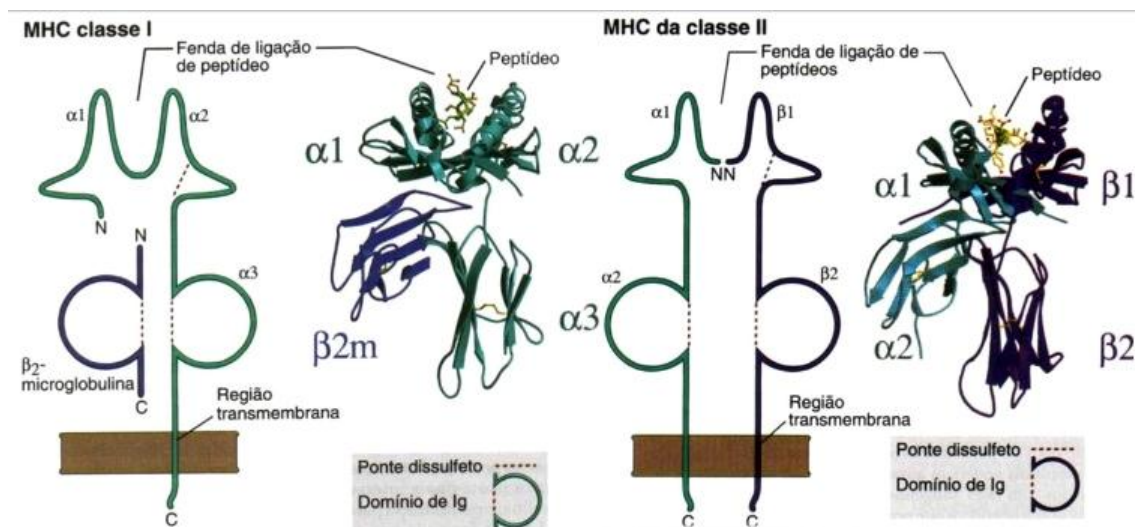
#### 3.2.2. MHC de Classe II

Moléculas HLA de classe II são heterodímeros codificadas por genes alfa e beta localizados na região *HLA-D*, no cromossomo 6p21.3 (TROWSDALE, 2001), como mostrado na figura 2, Ilustração da direita, abrangendo as três sub-regiões do complexo principal de histocompatibilidade DR, DQ e DP (os genes dessas três sub-regiões codificam os três principais isotipos de moléculas HLA de classe II: *HLA-DR*,

*HLA-DP* e *HLA-DQ*)(FIGURA 1). Tanto a cadeia alfa quanto beta das moléculas *HLA-DR* e *HLA-DP* são altamente polimórficas, enquanto que o *HLA-DR* alfa (*HLA-DRA*) é invariante e o *HLA-DR* beta (*HLA-DRB*), o mais altamente expresso, é codificado pelo gene *HLA-DRB1* e é extremamente polimórfico (DAI *et al.*, 2008). Larhammar *et al.* (1982) determinaram a sequência completa do *HLA-DR* e comentaram a semelhança entre essas moléculas e as moléculas do *HLA* de classe I.

Como a fenda de ligação ao antígeno de moléculas de MHC de classe II é aberta em ambas as extremidades enquanto a abertura correspondente nas moléculas de classe I é fechada, os antígenos apresentados por moléculas MHC de classe II são mais longos, geralmente entre 15 e 24 resíduos de aminoácidos de comprimento (JANEWAY *et al.*, 2001).

FIGURA 2- ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E II



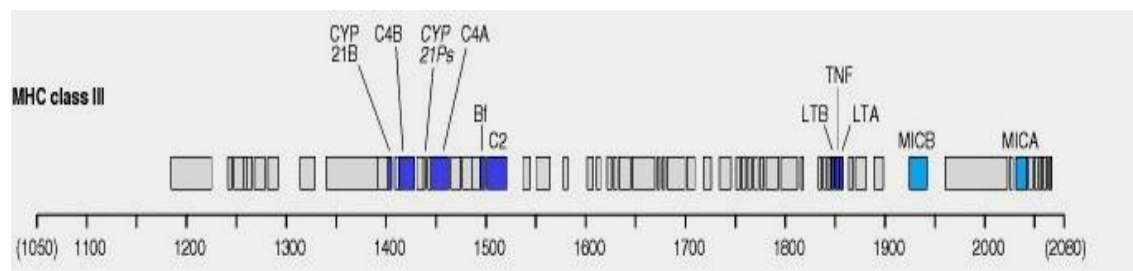
FONTE: Modificado de ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. The Major Complex Histocompatibility. In: Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia : Elsevier/Saunders, 2012 p. 64-83

NOTA: Na figura da esquerda está representado a molécula *HLA* de classe I. A cadeia pesada (em verde), codificado pelo cromossoma 6, tem uma massa molecular de 44.000 e é composta por três domínios N-terminais extracelulares de 90 aminoácidos cada , um segmento que atravessa a membrana hidrofóbica pequeno e um pequeno domínio C-terminal intracelular hidrofílico. O terceiro domínio , mais próximo da membrana , e a cadeia leve β2M (em azul) são altamente conservadas. A figura da direita representa os domínios que compõe a molécula *HLA* de classe II, com dois domínios α (α1 e α2) e dois domínios β (β1 e β2) externos com uma âncora citoplasmática. A porção distal da molécula de classe II, formada por α1 e β1 forma o sítio de "binding" do peptídeo. Em ambas as figuras está representado a interação dessas moléculas com um peptídeo (em amarelo).

### 3.2.3. MHC de Classe III

MHC de classe III é caracterizado por uma densidade extremamente elevada de genes, com 59 genes expressos e abrangendo aproximadamente 760kb no braço curto do cromossomo 6 (FIGURAS 1 e 3). Essa região inclui genes que participam do processo de ativação do complemento (*Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*), bem como os genes que codificam as citocinas: fator de necrose tumoral (TNF-  $\alpha$ ) e LTA (LT-  $\alpha$ ) (MATSUZAKA *et al.*, 2001), representado na figura 3. A suscetibilidade de várias doenças têm sido ligadas a essa região, incluindo a doença de Graves (HASHAM; TOMER, 2012), deficiência na 21- hidroxilase (FOREST, 2004) e lúpus eritematoso sistêmico (LES, doença que causa autoimunidade ao tecido conjuntivo)(LESSARD *et al.*, 1997).

FIGURA 3- MAPA DO MHC DE CLASSE III HUMANO



FONTE: Adaptado de **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th edition. JANEWAY, C. A. JR.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J..New York: Garland Science, 2001. p.198.

NOTA: Região de classe III do MHC humano. Essa região compreende os genes que codificam proteínas do complemento C4 (C4A e C4B), C2 e fator B (Bf), gene das citocinas: fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e LTA (LT-  $\alpha$ ). Está intimamente ligado ao gene C4 o gene 21-hidroxilase (CYP 21B, enzima envolvida na síntese de esteroides). Os genes mostrados em cinza e nomeados em *itálico* são pseudogenes.

### 3.3.MHC ESTENDIDO (xMHC)

A evidência de que havia genes MHC relevantes (HFE, TRIM38 e BTNs), forte desequilíbrio de ligação e a presença de sintonia conservada estendendo-se além dos limites que definiam o MHC humano fez com que Stephens *et al.* (1999, p. 291) acreditassem que poderia haver uma região MHC estendida (MHCx). Posteriormente, em 2003, o sequenciamento completo do cromossomo 6 definiu

esta região que abrange 7,6 Mb e mais 420 genes e está inserida no braço curto deste cromossomo ( MUNGALL *et al.*, 2003).

O processo de duplicação gênica é relativamente comum no genoma humano, estima-se que cerca de 5% dos genes humanos derivem de duplicações (BAILEY *et al.*, 2002), as quais são usadas para explicar a distribuição de famílias de genes (*clusters*) no genoma. Os principais agrupamentos de genes estão presentes na região do MHCx que constitui-se de pelo menos 6 *clusters* e 6 *superclusters* gênicos. Dentre eles os genes relacionados a resposta imune ( *HLA class I supercluster*; *HLA class II cluster*), os genes de citocinas (*tumor necrosis factor cluster*, que inclui o fator TNF, genes LTA e LTB), genes que codificam para histonas (*histones superclusters*) e genes receptores olfatórios que estão intimamente relacionados com processos comportamentais e reprodutivos (*olfactory receptor supercluster* e *vomeronasal-receptor cluster*)(TABELA 1) (HORTON *et al.*, 2004).

### 3.4. RECEPTORES OLFATÓRIOS

A percepção e a discriminação química de moléculas do meio, como a percepção das moléculas de odor, é realizada nos animais pelo órgão de sentido olfativo. Acredita-se que em seres humanos este órgão possa reconhecer mais de um trilhão de odores (BUSHDID *et al.*, 2014) com um poder tão alto de discriminação que uma sutil mudança na estrutura química pode levar a profundas diferenças na percepção do odor. Estudos envolvendo a base molecular da transdução de sinais relacionados ao sistema olfatório vêm sendo referidas em diversos estudos de várias áreas científicas (BOZZA *et al.*, 2002; VOSSHALL, 1999).

Em vertebrados, as moléculas de odor são reconhecidas por dois principais sistemas de reconhecimento: epitélio olfatório principal e órgão vomeronasal. Com aproximadamente 1000 genes (380 genes funcionais e 414 pseudogenes) a família de receptores olfatórios (ORs), que são expressos no epitélio olfatório, é considerada a maior do genoma humano (BUCK; AXEL, 1991) distribuindo-se em quase todos os cromossomos (MALNIC *et al.*, 2004) . Esta família codifica receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que são proteínas de membrana

constituídas por sete  $\alpha$ -hélices transmembranares, as quais são expressas no epitélio olfativo (FIGURA 5)(VENKATAKRISHNAN *et al.*, 2013).

TABELA 1- CLUSTERS E SUPERCLUSTERS DE GENES DENTRO DO MHC EXTENDIDO

| Cluster type              | Total number of loci | Number of protein-coding loci | Number of pseudo-gene/transcript loci |
|---------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Gene superclusters</b> |                      |                               |                                       |
| Histone                   | 66                   | 55                            | 11                                    |
| HLA class I               | 26                   | 9                             | 17                                    |
| tRNA                      | 157                  | 151                           | 6                                     |
| Butyrophilin              | 8                    | 8                             | 0                                     |
| Olfactory receptor        | 34                   | 14                            | 20                                    |
| Zinc finger protein       | 36                   | 26                            | 10                                    |
| <b>Gene clusters</b>      |                      |                               |                                       |
| Solute carrier 17A        | 4                    | 4                             | 0                                     |
| Vomeronasal receptor      | 5                    | 0                             | 5                                     |
| Tumour necrosis factor    | 3                    | 3                             | 0                                     |
| Lymphocyte antigen-6      | 5                    | 5                             | 0                                     |
| Heat shock protein        | 3                    | 3                             | 0                                     |
| HLA class II              | 24                   | 15                            | 9                                     |

FONTE: Adaptado de HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R. C.; BRUFORD, E. A.; KHODIYAR, V. K.; LUSH, M.J.; POVEY, S.; TALBOT, C.C. JR.; WRIGHT, M.; WAIN, H. M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, London, v.5, n.12, p.892, 2004.

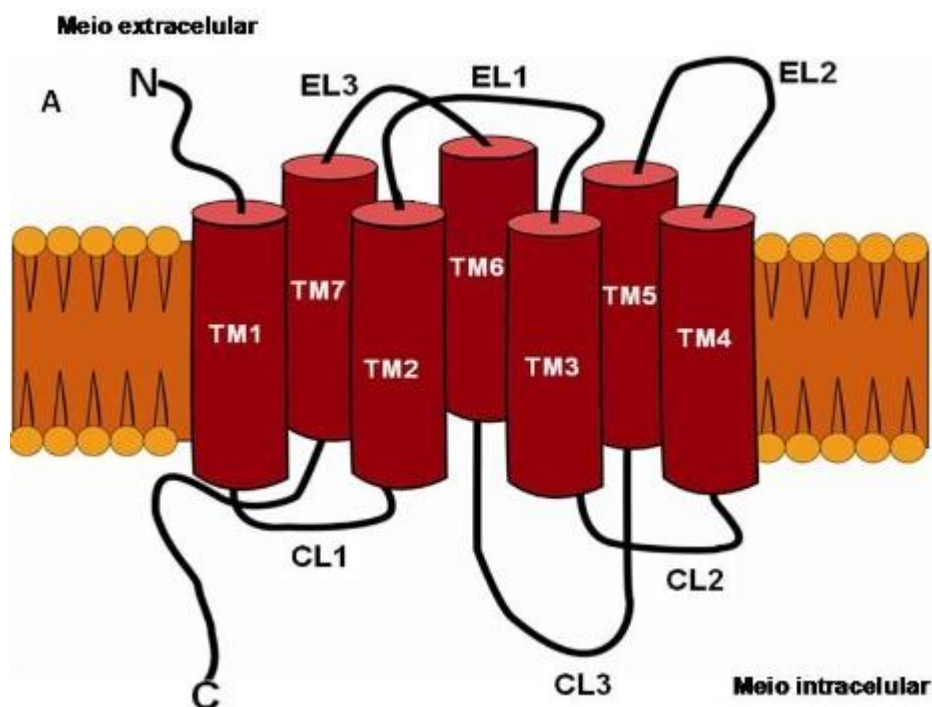
NOTA: A tabela contém os 6 *clusters* e 6 *superclusters* gênicos presente na região do MHC estendido. Inclusive os dois maiores *clusters* de genes do genoma humano estão inseridos, e parcialmente sobrepostos, nesta região (genes que codificam para histonas e tRNA).

Os mamíferos possuem múltiplos órgãos para detecção de odores: o epitélio olfativo (OE), o órgão vomeronasal (VNO), gânglio Grueneberg (GG) e o órgão septal de Masera (SO) (BREER *et al.*, 2006).

Quando inalamos o ar entra nas vias olfatórias e atinge o epitélio olfativo que está localizado na região dorsal da cavidade nasal. Inserido neste epitélio estão os neurônios receptores olfativo, uma célula bipolar que irá receber informação olfativa através dos receptores olfatórios (ORs) e transmiti-la para o bulbo olfatório, que se comunica com o sistema nervoso central, através de uma cascata de sinalização intracelular ( MORAN *et al.*, 1982).

A discriminação destas informações requer que o cérebro possa discernir qual dos inúmeros receptores foram ativados por um determinado odorante. Em mamíferos, apenas um dos mais de 1000 genes de receptores é expresso em cada um dos neurônios sensoriais olfativos. Sendo assim, cada neurônio é funcionalmente distinto para diferenciar as moléculas de odor (NGAI *et al.*, 1993).

FIGURA 4- CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G



FONTE: Adaptado de VENKATAKRISHNAN, A. J.; DEUPI, X.; LEBON, G; TATE, C. G.; SCHERTLER, G. F.; BABU, M. M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, v.494, p. 185–194, 2013.

NOTA: A ilustração mostra o arranjo espacial dos sete domínios transmembranais (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 e TM7) das proteínas GPCRs com a região N-terminal localizada extracelularmente e a região C-terminal intracelular, bem como as alças extracelulares (EL1, EL2 e EL3) e as alças intracelulares (IC1, IC2 e IC3)

### 3.5.OLFATO E MHC

Alguns dos genes da região MHC apresentam funções diferentes daquelas relacionadas ao sistema imunológico. O forte desequilíbrio de ligação entre alguns *clusters* de genes com haplótipos HLA (a combinação de alelos em locais adjacentes em um cromossomo herdados em conjunto) e o grande polimorfismo dos genes da região MHC (principalmente aqueles relacionados ao sistema olfativo -

receptores olfatórios) parecem influenciar no comportamento e percepção do meio pelas diferentes espécies.

Estudos têm mostrado que os genes do MHC servem para conferir identidade olfativa pessoal ("odortipo") (FERSTL *et al.*, 1992; YAMAZAKI *et al.*, 1999). Wedekind *et al.* (1995) constataram que a preferência das mulheres por odores masculinos está negativamente correlacionado com o grau de similaridade entre o seu próprio genótipo MHC. Muitos outros autores chegaram a resultados parecidos (SANTOS *et al.*, 2005; THORNHILL *et al.*, 2003). Estes, e outros trabalhos, sugerem que a preferência por parceiro com MHC distinto do seu próprio pode ser relacionado a pistas olfativas, como o "odortipo" (apesar de haver outras hipóteses a cerca desse tema). Esta escolha preferencial por parceiros com MHC dissimilares pode estar relacionado à adaptação, pois aumenta a heterozigosidade do MHC da prole, com influência benéfica sobre a viabilidade da mesma através do aumento da resistência a doenças infecciosas, e evitando efeitos de endogamia (MILINSKI, 2006).

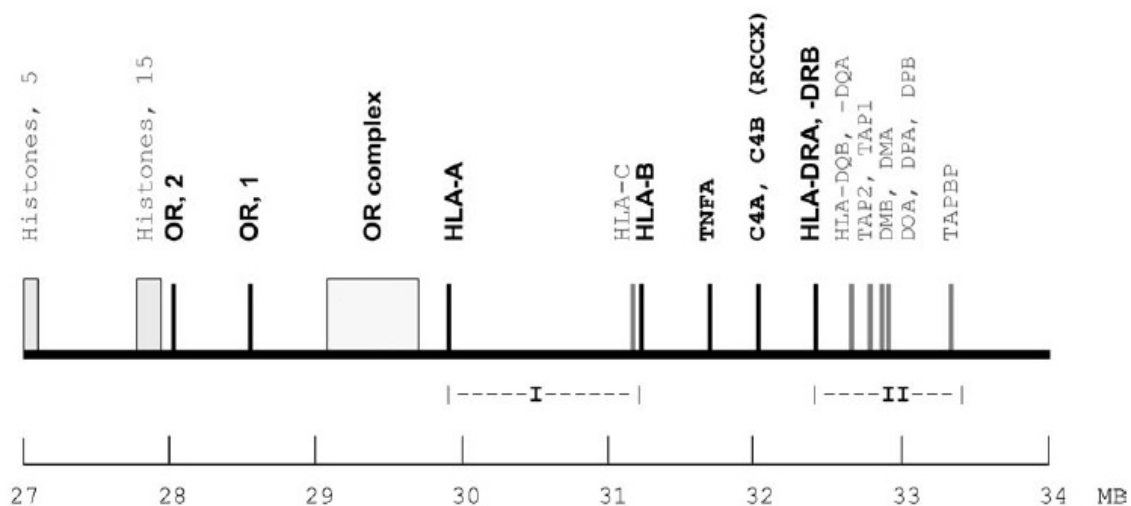
### 3.6. TABAGISMO, MHC, OLFATO E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O tabagismo é uma das maiores causas de morte pré-matura, doenças e invalidez em todo o mundo (EZZATI *et al.*, 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de cinco milhões de mortes todos os anos podem ser atribuídas ao uso do tabaco (podendo chegar perto de 8 milhões até o ano de 2030 se o crescimento continuar)( WHO report on the global tobacco epidemic: the mpower package, 2008)

O consumo de produtos oriundos do tabaco tem sido associado a diversas doenças, incluindo vários tipos de câncer ( pulmão, laringe, esôfago, boca, faringe, bexiga e muitos outros)( WORLD CONGRESS ON TOBACCO OR HEALTH, 2003), doenças autoimunes (como artrite reumatoide)(HILL *et al.*, 2003) e doença arterial coronária (WANG *et al.*, 2003). Apesar de estar bem estabelecido que a nicotina seja o componente viciante do cigarro (JARVIS, 2004) fatores genéticos e ambientais parecem influenciar na aquisição e continuação do hábito de fumar (BATRA *et al.*, 2003).

Sendo assim, além de influenciar em hábitos sexuais o alto grau de polimorfismo da região HLA e a existência de desequilíbrio de ligação com genes *ORs* parecem influenciar em outras características comportamentais, como o tabagismo, por estarem inseridos na mesma região genômica (FUGURA 7). Füst *et al.* (2004), baseado em estudos de marcadores moleculares para o hábito de fumar localizados no braço curto do cromossomo 6, descritos por BERGEN *et al.* (1999), encontraram evidências de que alelos HLA podem estar associados com o tabagismo (mulheres : *odds ratio*= 13,6 e homens: *odds ratio*=2,79). Em adição Santos *et al.* (2008), fundamentado pelos dois estudos anteriores, encontraram associação entre o haplótipo HLA-A8-B7-DR1 ( o haplótipo mais comum entre os caucasianos) e um receptor *OR* da mesma região cromossômica (gene: OR12D3, SNP: rs3749971).

FIGURA 5- MAPA GENÔMICO MOSTRANDO OS GENES MHC HUMANO E GENES RECEPTORES OLFATÓRIOS (OR) INSERIDOS ENTRE AS REGIÕES 6p21.33 e 6p21.31



FONTE: FÜST, G.; ARASON, G.; KRAMER, J.; SZALAI, C.; DUBA, J.; YANG, Y.; CHUNG, E. K.; ZHOU, B.; BLANCHONG, C. A.; LOKKI, M. L.; BÖDVARSSON, S.; PROHÁSZKA, Z.; KARÁDI, I.; VATAY, A.; KOVÁCS, M.; ROMICS, L.; THORGEIRSSON, G.; YU, C. Y. Genetic basis of tobacco smoking: strong association of a specific major histocompatibility complex haplotype on chromosome 6 with smoking behavior. **International Immunology**, Oxford, v.16, n.10, p.1507-1514, 2004.

NOTA: As marcações I e II da figura indicam as regiões do MHC de classe I e II, respectivamente. Os números após as histonas e OR representam o número de genes presentes na região. Estão inseridos também na figura as regiões dos genes C4A, C4B, TNFA. MB= Megabases.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. AMOSTRA

A amostra utilizada consistiu em 74144 indivíduos, de quatro grupos étnicos, classificados por auto-declaração conforme o critério do IBGE em amarelos, brancos, negros ou pardos. Do total, 13019 se declararam fumantes e 61125 se declararam não-fumantes. A amostra estava previamente genotipada para os *loci* HLA-A, -B, -DR em baixa/média resolução pela técnica SSO (sondas oligonucleotídicas específicas). Os dados foram obtidos do banco de dados de doadores voluntários de células tronco hematopoiéticas do LIGH (Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da UFPR). Este banco de dados tem sido utilizado por diversos pesquisadores, incluindo os trabalhos de SILVA *et al.* (2013) para investigação de diversidade genética de genes OR e os seus níveis de desequilíbrio de ligação com genes MHC.

A análise de desequilíbrio de ligação entre genes de receptores olfatórios e haplótipos HLA foi realizada por Santos *et al.* (2008), utilizando uma amostra de 180 indivíduos residentes de Utah (29 famílias, contendo 45 trios de país e prole relacionados) com descendência europeia (MIRETTI *et al.*, 2005).

A segunda amostra estudada era proveniente do banco de dados do LIGH, e composta por 61 trios familiares (pai, mãe e filhos) da população paranaense. Estavam previamente genotipados para os *loci* HLA-A, -B, -DR em baixa resolução e o genótipo para os genes OR foi determinado em trabalhos anteriores (para mais informações ver SILVA, 2012).

### 4.2. CÁLCULO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS E ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS

As frequências haplotípicas foram estimadas pelo método da maximização de expectativas, usando o programa Arlequin® versão 3.5 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). A análise de associação entre cada haplótipo e o tabagismo foi realizada por *odds ratio*, utilizando o suplemento SNP\_tools do programa EXCEL® (CHEN *et al.*, 2009) e incluiu o cálculo dos intervalos de confiança. A fim de evitar associações

espúrias, novas análises foram feitas dividindo-se a população por etnias (amarelo, branco, negros e pardos) e sexo, buscando associações consistentes em todas as subpopulações.

#### 4.3. ANÁLISE *IN SILICO* DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE tagSNPs DE GENES OR E HAPLÓTIPOS HLA

Uma vez encontradas associações positivas entre haplótipos HLA e tabagismo, procurou-se realizar testes *in silico* utilizando o programa Haploview (BARRETT *et al.*, 2005) com o objetivo de calcular o desequilíbrio de ligação entre os tagSNPs que caracterizam o *cluster* de receptores olfatórios presente próximos a região HLA, a partir dos dados de SANTOS *et al.* (2008)

A análise molecular *in silico* foi feita com dados de genotipagem de 180 indivíduos da amostra CEU (MIRETTI *et al.*, 2005), seguindo a mesma metodologia dos estudos de Santos *et al.* (2008).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir da estimativa da frequência haplotípica, foram encontrados 14540 haplótipos. Destes, 188 apresentaram *odds ratio* significativo nos dois sexos, sendo 18 associações positivas (mais frequentes em fumantes) e 170 associações negativas (mais frequentes em não fumantes). A fim de evitar associações espúrias, verificou-se a consistência das mesmas dividindo-se a população nas diversas etnias (amarelo, branco, negro e pardo), considerando-se consistente os casos em que a associação ocorreu em todos estes subgrupos. Apenas os haplótipos HLA-A1-B8-DR3, já conhecido dos estudos de Santos *et al.* (2008), e o haplótipo HLA-A24-B7-DR1 apresentaram *odds ratio* estatisticamente significativos (TABELA 2) em todos os subgrupos. Nota-se pela tabela 2, que a nova associação encontrada (haplótipo HLA-A24-B7-DR1) apresentou *odds ratio* mais alto do que para aquela já descrita, podendo ser um indicativo de associação positiva daquele haplótipo com o hábito tabagista. O grupo étnico "brancos" apresenta o maior *odds ratio* entre todos os subgrupos, inclusive entre o total da amostra. Isso, provavelmente, porque é o grupo com maior número de indivíduos e haplótipos, o que permitiu uma análise mais robusta (TABELA 3).

Para uma análise mais refinada da relação entre genes HLA e receptores olfatórios realizou-se testes de associação com dados de genotipagem de uma coorte de indivíduos caucasianos (população CEU). Entretanto, o número de indivíduos portadores do haplótipo alvo (HLA-A24-B7-DR1) era muito baixo e, portanto, a análise não pode ser completada. Como alternativa, optou-se por utilizar outra amostra de indivíduos genotipados do banco de dados de doadores voluntários de células tronco hematopoiéticas do LIGH. A amostra em questão continha 61 trios familiares (pai, mãe e filho) previamente genotipados para os *loci* HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 (depositados no banco de dados LIGH) e genotipados para os genes OR nos trabalhos de SILVA (2012). Neste caso os haplótipos envolvendo os *loci* HLA-A, -B, -DRB1, assim como os SNPs dos genes OR, puderam ser estritamente determinados. Novamente, os dados não foram suficientes para o cálculo do desequilíbrio de ligação entre genes OR e haplótipos HLA, uma vez que o número de indivíduos fumantes na amostra foi insuficiente para a análise de associação (apenas quinze indivíduos eram fumantes dos diversos haplótipos).

TABELA 2- HAPLÓTIPOS COM ASSOCIAÇÃO CONSISTENTE EM TODOS OS SUBGRUPOS

| Etnias   |          | HLA-A24-B7-DR1 |             | HLA-A1-B8-DR3 |           |
|----------|----------|----------------|-------------|---------------|-----------|
|          |          | <i>or</i>      | <i>IC</i>   | <i>or</i>     | <i>IC</i> |
| Amarelos | Homens   | 1,4506         | 0,56 - 3,74 | 0,7336        | 0,16-3,34 |
|          | Mulheres | 1,3703         | 0,59-03,16  | 0,5719        | 0,13-2,45 |
| Brancos  | Homens   | 2,7072         | 1,46-05,02  | 0,6664        | 0,58-0,76 |
|          | Mulheres | 2,3394         | 1,24-04,42  | 0,4533        | 0,40-0,52 |
| Negros   | Homens   | 0,0000         | 0,00-00,00  | 1,1377        | 0,61-2,14 |
|          | Mulheres | 4,7692         | 0,30-76,52  | 1,3648        | 0,61-3,03 |
| Pardos   | Homens   | 3,2143         | 0,62-16,79  | 1,3544        | 0,96-1,91 |
|          | Mulheres | 1,4129         | 0,16-12,84  | 1,0935        | 0,73-1,63 |
| Total    | Homens   | 1,6177         | 1,00-02,59  | 1,0900        | 0,97-1,24 |
|          | Mulheres | 1,7119         | 1,13-02,59  | 0,8800        | 0,78-0,99 |

FONTE: O autor

NOTA: A tabela apresenta os *odds ratio* (*or*), bem como os intervalos de confiança (*IC*) para os haplótipos com associação consistente em todos os subgrupos.

O haplótipo HLA-A1-B8-DR3, que estudos anteriores indicavam estar em associação positiva com o tabagismo, no presente trabalho também apresenta associação estatisticamente significativa, porém nem sempre no sentido positivo (apresentou associação positiva ( $or > 1$ ) em alguns subgrupos, porém está em associação negativa ( $or < 1$ ) em outros sub grupos e no total da amostra– TABELA2). É possível que este resultado não se mantenha em estudos com melhor caracterização dos fumantes (formando uma coorte que destaque todo o histórico do hábito tabagista). Também é possível que, em nossa população, o haplótipo não esteja associado aos mesmos alelos OR. Deve-se notar que na amostra dos 61 trios familiares do LIGH (para as quais todos os haplótipos são bem definidos) apenas sete indivíduos apresentavam este haplótipo e nenhum deles era tabagista.

TABELA 3 - NÚMERO ESTIMADO DE INDIVÍDUOS PORTADORES DOS HAPLÓTIPOS HLA-A1-B8-DR3, HLA-A24-B7-DR1 E PARA O TOTAL DA POPULAÇÃO

| Etnias   |          | HLA-A24-B7-DR1 |          | HLA-A1-B8-DR3 |          | Total    |          |
|----------|----------|----------------|----------|---------------|----------|----------|----------|
|          |          | Não            |          | Não           |          | Não      |          |
|          |          | Fumantes       | Fumantes | Fumantes      | Fumantes | Fumantes | Fumantes |
| Negros   | Homens   | 0              | 0        | 13            | 46       | 302      | 1217     |
|          | Mulheres | 1              | 1        | 8             | 28       | 251      | 1193     |
| Pardos   | Homens   | 2              | 3        | 44            | 155      | 782      | 3683     |
|          | Mulheres | 1              | 4        | 30            | 148      | 754      | 4058     |
| Branços  | Homens   | 18             | 22       | 287           | 1376     | 4655     | 15332    |
|          | Mulheres | 16             | 24       | 282           | 2047     | 5336     | 18685    |
| Amarelos | Homens   | 6              | 18       | 2             | 12       | 111      | 474      |
|          | Mulheres | 7              | 36       | 2             | 24       | 114      | 787      |
| Total    | Homens   | 26             | 50       | 364           | 1033     | 6208     | 19222    |
|          | Mulheres | 29             | 103      | 334           | 2318     | 6811     | 41903    |

FONTE: O autor

Os indivíduos cadastrados como doadores voluntários de medula óssea não formam uma coorte, no que diz respeito ao hábito de fumar. Isso, porque não há nenhuma especificação de dados como quanto tempo fumou durante a vida, qual marca de cigarro e, no caso de não-fumante, se já fumou em algum momento. Este fator, pode ter influenciado nos resultados da análise pois indivíduos que se intitulam não fumantes, por exemplo, poderiam ter fumado até pouco tempo.

Pode-se notar que o haplótipo HLA-A1-B8-DR3 não é o mais frequente na amostra dos 61 trios familiares (TABELA 4), o que difere dos dados da população de indivíduos caucasianos em que este é o haplótipo HLA mais comum, segundo os estudos de Alper *et al.* (2006). Provavelmente, isto se deve ao fato de que a população paranaense apresenta grande heterogeneidade de etnias (PROBST *et al.*, 2000)

TABELA 4 - MAIORES FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS HLA DOS 61 TRIOS FAMILIARES

| Frequência   | Haplótipo A-B-DRB1<br>(n=230) |           |           |
|--------------|-------------------------------|-----------|-----------|
| 0.026        | 02                            | 15        | 13        |
| 0.022        | 03                            | 07        | 15        |
| 0.017        | 03                            | 07        | 04        |
| <b>0.017</b> | <b>01</b>                     | <b>08</b> | <b>03</b> |
| 0.017        | 02                            | 50        | 07        |
| 0.017        | 11                            | 35        | 01        |
| 0.017        | 03                            | 35        | 01        |
| 0.013        | 02                            | 49        | 13        |
| 0.013        | 02                            | 15        | 14        |
| 0.013        | 02                            | 27        | 01        |

FONTE: Modificado de SILVA, J. S. **Caracterização dos polimorfismos nos genes *OR2W6P*, *OR2B8P*, *OR1F12* e *OR12D2* em uma amostra da população paranaense.** 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

## 6. CONCLUSÕES

O haplótipo HLA-A24-B7-DR1 apresentou-se fortemente associado ao hábito tabagista. É provável que tal haplótipo esteja em desequilíbrio de ligação com algum alelo de um gene de receptor olfatório, situado na região xHLA. Se isto de fato ocorre, então tal alelo está possivelmente implicado na gênese da condição tabagista. Este desequilíbrio não pôde ser investigado porque o haplótipo é relativamente raro e não foi encontrado na amostra CEU usada no presente estudo e tampouco na amostra dos 61 trios familiares provenientes do LIGH.

O haplótipo HLA-A1-B8-DR3 não apresentou resultados estatisticamente significativos no sentido positivo de associação. Em novas análises, com melhor caracterização dos indivíduos fumantes, pode ser que esses resultados não se mantenham.

A associação do haplótipo HLA-A24-B7-DR1 com o tabagismo, indicada pelo presente estudo, justifica investigações posteriores, com dados mais precisos, particularmente no que diz respeito à caracterização das amostras de fumantes e não fumantes, ou seja, para os fumantes determinar quantos cigarros fuma por dia, há quanto tempo fuma, e qual marca de cigarro mais usa e, entre os não fumantes, verificar se já foi fumante anteriormente. Se, nestas condições, a associação for comprovada, a mesma amostra deverá ser investigada com relação aos genes OR. Para tanto, seria necessária a genotipagem dos genes HLA e de receptores olfatórios.

Este estudo, assim como os demais trabalhos sobre o assunto, visou contribuir para o esclarecimento de fatores biológicos implicados na gênese do hábito de fumar cuja importância para a saúde pública não pode ser minimizada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. The Major Complex Histocompatibility. In: **Cellular and molecular immunology**. 7th ed. Philadelphia : Elsevier/Saunders, 2012. p. 64-83.

ALPER, C. A.; LARSEN, C. E.; DUBEY, D. P.; AWDEH, Z. L.; FICI, D. A.; YUNIS, E. J. The haplotype structure of the human major histocompatibility complex. **Human Immunology**, New York, v.67, n.1-2, p.73–84, 2006.

BAILEY, J. A.; GU, Z.; CLARK, R. A.; REINERT, K.; SAMONTE, R. V.; SCHWARTZ, S.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; EICHLER, E. E. Recent segmental duplications in the human genome. **Science**, New York, v.297, n.5583, p.1003–1007, 2002.

BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, Cambridge, v.21, n.2, p.263-265, 2005.

BATRA, V.; PATKAR, A. A.; BERRETTINI, W. H.; WEINSTEIN, S. P.; LEONE, F. T. The genetic determinants of smoking. **Chest**, Chicago, v.123, n.5, p.1730-1739, 2003.

BERGEN, A. W.; KORCZAK, J. F.; WEISSBECKER, K. A.; GOLDSTEIN, A. M. A genome-wide search for loci contributing to smoking and alcoholism. **Genetic Epidemiology**, New York, v.17, n.1, p.55-60, 1999.

BICALHO, M. G.; SANTOS, P. S. C.; SILVA, W. A.; RUIZ, T. M. Sistema LIGH: disponibilizar para o Redome em tempo real as informações do doador voluntário de medula óssea. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 27, n. 2, p. 138-147, 2005.

BLUE, M. L.; HOLFER, D. A.; DALEY, J. F.; LEVINE, H.; CRAIG, K. A.; BREITMAYER, J. B.; SCHLOSSMAN, S. F. Regulation of T cell clone function via CD4 and CD8 molecules: anti-CD4 can mediate two distinct inhibitory activities. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.140, n.2, p.376-383, 1988.

BOECHAT, N. O.; OGUSKU, M. M.; BOECHAT, A. L.; SADAHIRO, A. Interaction between Smoking and HLA-DRB1\*04 Gene Is Associated with a High Cardiovascular



Risk in Brazilian Amazon Patients with Rheumatoid Arthritis. **Public Library of Science**, San Francisco, v.7, n.8, p.1-9, 2012.

BOZZA, T.; FEINSTEIN, P.; ZHENG, C.; MOMBAERTS, P. Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. **The Journal of neuroscience**, Baltimore, v.22, n.8, p.3033-3043, 2002.

BREER, H.; FLEISCHER, J.; STROTMANN, J. The sense of smell: multiple olfactory subsystems. **Cellular And Molecular Life Sciences**, Boston, v. 63, n.13, p.1465-1475, 2006.

BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. **Cell**, Cambridge, v.65, n.1, p.175-187, 1991.

BUSHDID, C.; MAGNASCO, M. O.; VOSSHAL, L. B.; KELLER, A. Humans Can Discriminate More than 1 Trillion Olfactory Stimuli. **Science**, New York, v. 343, n. 6177, p. 1370-1372, 2014.

CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. **Immunology Today**, Amsterdam, v.14, n.7, p.349-352, 1993.

CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N.; PAUL, P.; DAUSSET, J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 60-62, 1999.

CHEN, B., WILKENING, S.; DRECHSEL, M.; HEMMINKI, K. **SNP\_tools: A compact tool package for analysis and conversion of genotype data for MS-Excel**. BMC Research Notes, v.2, n. 1, p. 214, 2009.

COMPLETE sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **The MHC sequencing consortium**, London, v.401, n.6756, p.921-923, Oct. 1999.

DAI, S.; CRAWFORD, F.; MARRACK, P.; KAPPLER, J. W. The structure of HLA-DR52c: comparison to other HLA-DRB3 alleles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.105, n.33, p.11893-11897, 2008.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, n.3, p. 564-567, 2010.

EZZATI, M.; LOPEZ, A. D.; RODGERS, A.; VANDER HOORN, S.; MURRAY, C. J.; THE COMPARATIVE RISK ASSESSMENT COLLABORATING GROUP. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **Lancet**, v.360, n.1347, p.1347-1360, 2002.

FERSTL, R.; EGGERT, F.; WESTPHAL, E.; ZAVAZAVA, N.; MULLER-RUCHHOLTZ, W. MHC-Related Odors in Humans. In: **Chemical Signals in Vertebrates 6**. 6th. ed. New York, 1992, p. 205–211.

FIGUEROA, F.; GUNTHER, E.; KLEIN, J. MHC polymorphism pre-dating speciation. **Nature**, London, v.335, n.6187, p.265-267, 1988.

FOREST, M. G. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Human Reproduction**, Oxford, v.10, n.6, p.469-85, 2004.

FÜST, G.; ARASON, G.; KRAMER, J.; SZALAI, C.; DUBA, J.; YANG, Y.; CHUNG, E. K.; ZHOU, B.; BLANCHONG, C. A.; LOKKI, M. L.; BÖDVARSSON, S.; PROHÁSZKA, Z.; KARÁDI, I.; VATAY, A.; KOVÁCS, M.; ROMICS, L.; THORGEIRSSON, G.; YU, C. Y. Genetic basis of tobacco smoking: strong association of a specific major histocompatibility complex haplotype on chromosome 6 with smoking behavior. **International Immunology**, Oxford, v.16, n.10, p.1507-1514, 2004.

GODFREY, P.A.; MALNIC, B.; BUCK, L. B. The mouse olfactory receptor gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.101, n.7, p.2156-2161, 2004.

GORER, P. A. The detection of a hereditary antigenic difference in the blood of mice by means of human group A serum. **Journal of Genetics**, Bangalore, v.32, n.1, p.17–31, 1936.

GOURRAUD, P. A.; HARBOR, H. F.; HAUSER, S. L.; BARANZINI, S. E.; The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. **Immunological Review**, Copenhagen, v.248, n.1, p.87-103, 2012.

GUSSOW, D.; REIN, R.; GINJAAR, I.; HOCHSTENBACH, F.; SEEMANN, G.; KOTTMAN, A.; PLOEGH, H. L. The human beta-2-microglobulin gene: primary structure and definition of the transcriptional unit. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.139, n.9, p.3132-3138, 1987.

HASHAM, A.; TOMER, Y. Genetic and epigenetic mechanisms in thyroid autoimmunity. **Immunologic Research**, New York, v.54, n.1-3, p.204-13, 2012.

HILL, J. A.; SOUTHWOOD, S.; SETTE, A.; JEVNIKAR, A. M.; BELL, D. A.; CAIRNS, E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. **The Journal of immunology**, v.171, n.2, p.538-541, 2003

HOOD, L.; STEINMETZ, M.; GOODENOW, R. Genes of the major histocompatibility complex. **Cell**, Cambridge, v. 28, n.7, p.685-687, 1982.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R. C.; BRUFORD, E. A.; KHODIYAR, V. K.; LUSH, M.J.; POVEY, S.; TALBOT, C.C. JR.; WRIGHT, M.; WAIN, H. M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics** , London, v.5, n.12, p.889-899, 2004.

JANEWAY, C. A. JR.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; Shlomchik, M. J. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th edition. New York: Garland Science, 2001. p.143-217.

JARVIS, M. J. Why people smoke. **British Medical Journal**, Reino Unido, v.328, n.7434, p.277–279, 2004.

KENDLER, K. S.; THORNTON, L. M.; PEDERSEN, N. L. Tobacco consumption in Swedish twins reared apart and reared together. **Archives Of General Psychiatry**, Chicago, v. 57, n.9, p.886-892, 2000.

KLEIN, J. Seeds of time: fifty years ago Peter A. Gorer discovered the H-2 complex. **Immunogenetics**, New York, v.24, n.6, p.331–338, 1986.

LAMM, L.U.; OLAISEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 5 and 6. **Cytogenetics and Cell Genetics**, New York, v. 40, n. 1-4, p. 128-155, 1985.

LARHAMMAR, D.; SCHENNING, L.; GUSTAFSSON, K.; WIMAN, K.; CLAEISSON, L.; RASK, L.; PETERSON, P. A. Complete amino acid sequence of an HLA-DR antigen-like beta chain as predicted from the nucleotide sequence: similarities with immunoglobulins and HLA-A, -B, and -C antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.79, n.12, p.3687-3691, 1982.

LESSARD, E.; FORTIN, A.; BELANGER, P. M.; BEAUNE, P.; HAMELIN, B. A.; TUREGON, J. Role of CYP2D6 in the N-hydroxylation of procainamide. **Pharmacogenetics**, London, v.7, n.5, p.381-390, 1997.

MALISSEN, M.; MALISSEN, B.; JORDAN, B. R. Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.79, n.3, p.893-897, 1982.

MALNIC, B.; GODFREY, P.A.; BUCK, L.B. The human olfactory receptor gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.101, n.8, p.2584-2589, 2004.

MALNIC, B.; HIRONO, J.; SATO, T.; BUCK, L.B. Combinatorial receptor codes for odors. **Cell**, Cambridge, v.96, n.5, p.713-723, 1999.

MATSUZAKA, Y.; MAKINO, S.; NAKAJIMA, K.; TOMIZAWA, M.; OKA, A.; BAHRAM, S.; KULSI, J. K.; TAMIYA, G.; INOKO, H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.57, n.5, p.397-404, 2001.

McCLINTOCK, M. K. Menstrual synchrony and suppression. **Nature**, London, v.229, n.5282, p.244-245, 1971.

MILINSKI, M. The major histocompatibility complex, sexual selection and mate choice. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.37, n.1, p.159–186, 2006.

MIRETTI, M. M.; WALSH, E. C.; KE, X.; DELGADO, M.; GRIFFITHS, M.; HUNT, S.; MORRISON, J.; WHITTAKER, P.; LANDER, E. S.; CARDON, L. R.; BENTLEY, D. R.; RIOUX, J. D.; BECK, S.; DELOUKAS, P. A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. **American Society of Human Genetics**, Baltimore, v. 76, n.4, p.634–646, 2005.

MITCHELL, R.F.; HUGHES, D.T.; LUETJE, C.W.; MILLAR, J.G.; SORIANO-AGATON, F.; HANKS, L.M.; ROBERTSON, H.M. Sequencing and characterizing odorant receptors of the cerambycid beetle *Megacyllene caryae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.42, n.7, p.499-505, 2012.

MORAES, J. R. F.; MORAES, M. E. H. Distribuição dos alelos HLA na população brasileira. **Hematologia Hemoterapia**, São Paulo, v.1, n.1, p.18-23, 1996.

MORAN, D. T.; ROWLEY, J. C. 3RD.; JAFEK, B. W.; LOVELL, M. A. The fine structure of the olfactory mucosa in man. **Journal of Neurocytology**, London, v.11, n.5, p.721–746, 1982.

MUNGALL, A. J.; PALMER, S. A.; SIMS, S. K.; EDWARDS, C. A.; ASHURST, J. L.; WILMING, L.; JONES, M. C.; HORTON, R.; HUNT, S. E.; SCOTT, C. E.; GILBERT, J. G. R.; CLAMP, M. E.; BETHEL, G.; MILNE, S.; AINSCOUGH, R.; ALMEIDA, J. P.; AMBROSE, K. D.; ANDREWS, T. D.; ASHWELL, R. I. S.; BABBAGE, A. K.; BAGGULEY, C. L.; BAILEY, J.; BANERJEE, R.; BARKER, D. J.; BARLOW, K. F.; BATES, K.; BEARE, D. M.; BEASLEY, H.; BEASLEY, O.; BIRD, C. P.; BLAKEY, S.; BRAY-ALLEN, S.; BROOK, J.; BROWN, A. J.; BROWN, J. Y.; BURFORD, D. C.; BURRILL, W.; BURTON, J.; CARDER, C.; CARTER, N. P.; CHAPMAN, J. C.; CLARK, S. Y.; CLARK, G.; CLEE, C. M.; CLEGG, S.; COBLEY, V.; COLLIER, R. E.; COLLINS, J. E.; COLMAN, L. K.; CORBY, N. R.; COVILLE, G. J.; CULLEY, K. M.; DHAMI, P.; DAVIES, J.; DUNN, M.; EARTHROWL, M. E.; ELLINGTON, A. E.; EVANS, K. A.; FAULKNER, L.; FRANCIS, M. D.; FRANKISH, A.; FRANKLAND, J.; FRENCH, L.; GARNER, P.; GARNETT, J.; GHORI, M. J. R.; GILBY, L. M.; GILLSON, C. J.; GLITHERO, R. J.; GRAFHAM, D. V.; GRANT, M.; GRIBBLE, S.; GRIFFITHS, C.; GRIFFITHS, M.; HALL, R.; HALLS, K. S.; HAMMOND, S.; HARLEY, J. L.; HART, E. A.; HEATH, P. D.; HEATHCOTT, R.; HOLMES, S. J.; HOWDEN, P. J.; HOWE, K. L.; HOWELL, G. R.; HUCKLE, E.; HUMPHRAY, S. J.; HUMPHRIES, M. D.; HUNT, A. R.; JOHNSON, C. M.; JOY, A. A.; KAY, M.; KEENAN, S. J.; KIMBERLEY, A. M.; KING, A.; LAIRD, G. K.; LANGFORD, C.; LAWLOR, S.; LEONGAMORNLEET, D. A.; LEVERSHA, M.; LLOYD, C. R.; LLOYD, D. M.; LOVELAND, J. E.; LOVELL, J.; MARTIN, S.; MASHREGHI-MOHAMMADI, M.; MASLEN, G. L.; MATTHEWS, L.; MCCANN, O. T.; MCLAREN, S. J.; MCLAY, K.; MCMURRAY, A.; MOORE, M. J. F.; MULLIKIN, J. C.; NIBLETT, D.; NICKERSON, T.; NOVIK, K. L.; OLIVER, K.; OVERTON-LARTY, E. K.; PARKER, A.; PATEL, R.; PEARCE, A. V.; PECK, A. I.; PHILLIMORE, B.; PHILLIPS, S.; PLUMB, R. W.; PORTER, K. M.; RAMSEY, Y.; RANBY, S. A.; RICE, C. M.; ROSS, M. T.; SEARLE, S. M.; SEHRA, H. K.; SHERIDAN, E.; SKUCE, C. D.; SMITH, S.; SMITH, M.; SPRAGGON, L.; SQUARES, S. L.; STEWARD, C. A.; SYCAMORE, N.; TAMLYN-HALL, G.; TESTER, J.; THEAKER, A. J.; THOMAS, D. W.; THORPE, A.; TRACEY, A.; TROMANS, A.; TUBBY, B.; WALL, M.; WALLIS, J. M.; WEST, A. P.; WHITE, S. S.; WHITEHEAD, S. L.; WHITTAKER, H.; WILD, A.; WILLEY, D. J.; WILMER, T. E.; WOOD, J. M.; WRAY, P. W.; WYATT, J. C.; YOUNG, L.; YOUNGER, R. M.; BENTLEY, D. R.; COULSON, A.; DURBIN, R.; HUBBARD, T.; SULSTON, J. E.; DUNHAM, I.; ROGERS, J.; BECK, S. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. **Nature**, London, v.425, n. 6960, p.805-811, 2003.

NGAI, J.; CHESS, A.; DOWLING, M. M.; NECLES, M.; MACAGNO, E. R.; AXEL, R. Coding of olfactory information: topography of odorant receptor expression in the catfish olfactory epithelium. **Cell**, Cambridge, v. 72 , n. 5, p. 667–680, 1993.

O'CALLAGHAN, C.; BELL, J.I. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 163, n.1, p. 129-138, 1998.

PROBST, C. H.; BOMPEIXE, E. P.; PEREIRA, N. F.; O DALALIO, M. M.; VISENTAINER, J. E.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L. HLA polymorphism and evaluation of European, African and Amerindian contribution to the White and Mulatto populations from Paraná, Brazil. **Human Biology**, Michigan, v.72, n.4, p.597-617, 2000.

SANTOS, P. S. C.; SCHINEMANN, J. A.; GABARDO, J.; BICALHO, M. D. New evidence that the MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian students. **Hormones and Behavior**, New York, v.47, n.4, p.384-388, 2005

SANTOS, P. S.; FÜST, G.; PROHÁSZKA, Z.; VOLZ, A.; HORTON, R.; MIRETTI M.; YU, C. Y.; BECK, S.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; ZIEGLER, A. Association of smoking behavior with an odorant receptor allele telomeric to the human major histocompatibility complex. **Genetic Testing**, Larchmont , v.12, n.4, p. 481–486, 2008.

SILVA, J. S. **Caracterização dos polimorfismos nos genes *OR2W6P*, *OR2B8P*, *OR1F12* e *OR12D2* em uma amostra da população paranaense**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SILVA, J. S.; WOWK, P. F.; POERNER, F.; SANTOS, P. S.; BICALHO, M. G. Absence of strong linkage disequilibrium between odorant receptor alleles and the major histocompatibility complex. **Human Immunology**, New York, v. 74, n.12, p.1619–1623, 2013.

STEPHENS, R.; HORTON, R.; HUMPHRAY, S.; ROWEN, L.; TROWSDALE, J.; BECK, S. Gene organisation, sequence variation and isochore structure at the centromeric boundary of the human MHC. **Journal of Molecular Biology**, London, v.291, n.4, p.789–799, 1999.

STRACHAN, T. Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. **British Medical Bulletin**, Oxford, v.43, n.1, p.1-14, 1987.

SULLIVAN, P. F.; KENDLER, K. S. The genetic epidemiology of smoking. Nicotine. **Nicotine & Tobacco Research**, Abingdon, v.1, n.2, p. 51-57, 1999.

TEMPLE, I. K.; SHIELD, J. P. 6p24 transient neonatal diabetes. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, Boston, v.11, n.3, p.199-204, 2010.

THE International HapMap Consortium. **A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs**. *Nature*, London, v. 229, n.5282, p. 851-861. 2007.

THORNHILL, R.; GANGESTAD, S. W.; MILLER, R.; SCHEYD, G.; MCCOLLOUGH, J. K.; FRANKLIN, M. Major histocompatibility complex genes, symmetry, and body scent attractiveness in men and women. **Behavioral Ecology**, Oxford, v.14, n.5, p.668-678, 2003.

TROWSDALE, J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. **Immunity**, Cambridge, v.15, n.2, p.363-374, 2001.

URBAN, M.; BOMMER, C.; TENNSTEDT, C.; LEHMANN, K.; THIEL, G.; WEGNER, R. D.; BOLLMANN, R.; BECKER, R.; SCHULZKE, I.; KORNER, H. Ring chromosome 6 in three fetuses: case reports, literature review, and implications for prenatal diagnosis. **American Journal of Medical Genetics**, New York, v.108, n.2, p.97-104, 2002.

VENKATAKRISHNAN, A. J.; DEUPI, X.; LEBON, G.; TATE, C. G.; SCHERTLER, G. F.; BABU, M. M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. **Nature**, London, v.494, n.7436, p.185–194, 2013.

VOSSHALL, L. B.; AMREIN, H.; MOROZOV, P. S.; RZHETSKY, A.; AXEL, R. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. **Cell**, Cambridge, v.96, n.5, p.725-736, 1999.

WANG, L.; FAN, C.; TOPOL, S. E.; TOPOL, E. J.; WANG, Q. Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. **Science**, v.302, n.5650, p.1578-1581, 2003.

WEDEKIND, C.; SEEBECK, T.; BETTENS, F.; PAEPKE, A. J. MHC-dependent mate preferences in humans. **Proceedings Biological Sciences**, London, v.260, n.1359, p.245-249, 1995.

WHO report on the global tobacco epidemic: the MPOWER package. **World Health Organization**, Geneva, 2008

WORLD CONGRESS ON TOBACCO OR HEALTH, 12., 2003, Atlanta. **Tobacco Control Profiles**. Atlanta: American Cancer Society, 2003.

YAMAZAKI, K.; BEAUCHAMP, G.K.; SINGER, A.; BARD, J.; BOYSE, E.A. Odortypes: Their origin and composition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n.4, p.1522–1525, 1999

ZIEGLER, A. Biology of chromosome 6. **DNA sequence**, London, v.8, n.3, p.189-201, 1997.

WEDEKIND, C.; PENN, D. MHC genes, body odours, and odour preferences. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.15, n.9, p.1269-1271, 2000.